

Helsinki 18.12.2003

E T U O I K E U S T O D I S T U S  
P R I O R I T Y D O C U M E N T

RECD 1,3 FEB 2004

WIPO

PCT



Hakija  
Applicant

Valio Oy  
Helsinki

Patentihakemus nro  
Patent application no

20021968

Tekemispäivä  
Filing date

04.11.2002

Kansainvälinen luokka  
International class

C12N

Keksinnön nimitys  
Title of invention

"Menetelmä hiivojen kasvun estämiseksi"

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

Täten todistetaan, että oheiset asiakirjat ovat tarkkoja jäljennöksiä  
Patentti- ja rekisterihallitukselle alkuaan annetuista selityksestä,  
patenttivaatimuksista ja tiivistelmästä.

This is to certify that the annexed documents are true copies of the  
description, claims and abstract originally filed with the Finnish Patent  
Office.

Eija Solja  
Apulaistarkastaja

Maksu 50  
Fee 50 EUR

Maksu perustuu kauppa- ja teollisuusministeriön antamaan asetukseen 1027/2001  
Patentti- ja rekisterihallituksen maksullisista suoritteista muutoksineen.

The fee is based on the Decree with amendments of the Ministry of Trade and Industry No.  
1027/2001 concerning the chargeable services of the National Board of Patents and  
Registration of Finland.

## Menetelmä hiivojen kasvun estämiseksi

### **Keksinnönala**

- Keksintö liittyy hiivojen kasvun estämiseen. Erityisesti kuvataan
- 5 tuotteita ja menetelmiä hiivojen kasvun estämiseksi ja hiivojen aiheuttamien tautien ennaltaehkäisemiseksi ja hoitamiseksi.

### **Keksinnön tausta**

- Ihmisen ympäristössä ja elimistössä on jatkuvasti hiivoja. Terveelläkin ihmisellä kasvaa limakalvoilla ja koko ruoansulatuskanavan alueella *Candida albicans*-hiiva (Shay K, Truhlar MR, Renner RP. Oropharyngeal candidosis in the older people. *J Am Geriatr Soc* 1997;45:863-870). Myös suuontelo ja hampaiden välikudokset ovat hyvä kasvualusta lukuisille mikrobilajeille, ja näistä löytyykin mm. *Candida albicans* -lajia ja pienemmissä määrin *C. glabrata* - ja *C. tropicalis* -hiivoja. Normaalisti hiivasolut ovat passiivisessa tilassa, eikä niiden kasvusta ole terveille ihmisiille haittaa. Epäsuotuisissa olosuhteissa hiivat, kuten *C. albicans*, alkavat muodostaa sienirihmoja ja tunkeutua rihmanmuodostuksen kautta syvemmälle limakalvoihin. Näin syntyy paikallinen hiivainfektio, suussa esim. suusammas, suutulehdus tai kielitulehdus.
- 20 Hiivainfektoiden synnyn edellytyksenä on yleensä vastustuskyvyn heikkeneminen, johon voi olla syynä tiettyjen lääkkeiden, kuten laajakirjoisten antibioottien, kortikosteroidien tai sytostaattien käyttö, diabetes, pahanlaatuiset kasvaimet ja immuunihäiriöt. Suun mikro-organismit leviävät helposti verenkiuron välityksellä muualle elimistöön, josta saattaa olla vakaviakin seurauksia, kuten verenmyrkytys, sydämen sisäkalvon ja aivokalvon tulehdus, etenkin henkilöille, joiden yleinen terveydentila on heikentynyt (Shay ym. 1997).
- 25 Ihmisellä yleisin ja tärkein hiivainfektion aiheuttaja on *Candida albicans* (Mäkelä ym. 1988. Lääketieteellinen mikrobiologia 5. uusittu painos s. 270-271. Kustannus Oy Duodecim 1988). Terveen ihmisen ruoansulatuskana-vaista *C. albicans* löytyy aika usein, suusta 30 - 50 prosentilta, terveeltä iholta ja virtsateistä n. 1 prosentilta ihmisiltä. Myös muita *Candida*-sukuun kuuluvia lajeja voidaan satunnaisesti löytää. Tärkeimpä niistä ovat *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ja *C. guilliermondii*, jotka ovat ihmisen opportunistisia patogeeneja, kuten *C. albicans* (Mäkelä ym. 1988).

- Ikääntyvillä tyyppillisesti esiintyvätkin lukuisat sairaudet ja niihin käytetyt lääkkeet saattavat heikentää immuneettia ja samalla hammasterveyttä (Pajukoski H, Meurman JH, Snellman-Gröhn S, Sulkava R. Oral health in hospitalized and nonhospitalized community-dwelling elderly patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;88:437-443). Myös huono suuhygienia altistaa vanhukset hiivainfektioille (Budtz-Jorgensen E, Mojon P, Banon-Clement JM, Baehni P. Oral candidosis in long-term hospital care: comparison of edentulous and dentate subjects. *Oral Dis* 1996;2:285-290). Ikääntyminen sinänsä lisää hiivan esiintyvyyttä ja määrää, mikä viittaa siihen, että elimistön hiivan kasvua estävä vaikutus heikkenee iän myötä (Lockhart SR, Joly S, Vargas K, Swails-Wenger J, Enger L, Soil DR. Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. *J Dent Res* 1999;78:857-868).

- Helsinkiläisvanhuksista suun hiivan kasvua on löydetty 75 %:lla ja korkeita pitoisuksia 33 %:lla (Närhi TO, Ainamo A, Meurman JH. Salivary yeasts, saliva, and oral mucosa in the elderly. *J Dent Res* 1993 ;72:1009-1014). *Candida*-hiivainfektio on löytynyt puolestaan 60 %:ltä hiivan kantajista (Wilkieson C, Samaranayake LP, MacFarlane TW, Lamey PJ ym. Oral candidosis in the elderly in long term hospital care. *J Oral Pathol Med* 1991;20:13-16). *Candida albicans* -lajin jälkeen seuraavaksi yleisimmät hiivat ovat *C. glabrata* (29 %), *C. tropicalis* (13 %), *Saccharomyces cerevisiae* (11 %) ja *C. parapsilosis* (9 %) (Lockhart ym. 1999).

- Eräs tärkeä hiivan kasvua suussa lisäävä tekijä on syljen erityksen vähenneminen (Närhi ym. 1993). Ikääntymisen vaikutuksia selvittäneessä viisi vuotisseurannassa havaittiin, että stimuloitu kokosyljen eritys vähenee, mutta puskurikapasiteetti nousee ikääntyessä (Närhi TO, Kurki N, Ainamo A. Saliva, salivary micro-organisms, and oral health in the home-dwelling old elderly - a five- year longitudinal study. *J Dent Res* 1999;78:1640-1646). Erityisesti runsas lääkkeiden käyttö ja endokrinologiset sairaudet vähentävät syljen eritystä (Pajukoski H, Meurman JH, Snellman-Gröhn S, Keinänen S, Sulkava R. Salivary flow and composition in elderly patients referred to an acute care geriatric ward. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997;84:265-71). Hiivan pitoliuheet olivat selkeästi korkeammat niillä, joiden syljen eritysnopeus ja puskurikapasiteetti olivat alentuneet (Närhi ym. 1993). Syljen eritysnopeus 35 suomalaisvanhuksilla vaihtelee välillä 0,6 - 1,0 ml/mm (Pajukoski ym. 1997) ja

alentunutta eritystä (< 0,7 ml/mm) havaitaan peräti 55 %:lla ja alhainen puskurikapasiteetti 34 %:lla vanhuksista (Pajukoski ym. 1997).

- Kandidoosia hoidetaan perinteisesti hiivalääkkeillä, kuten nystatiinilla, vaikeampia tapauksia flukonatsolilla tai itrakonatsolilla (Shay ym. 1997).
- 5 Myös suun hygienian tehostamisella on voitu vähentää pitkääikaishoidossa olevien vanhusten suun limakalvojen kolonisoitumista *Candida* (Budtz-Jorgensen E, Mojon P, Rentsch A, Deslauriers N. Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a long-term care facility. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000;28:141-149). Myös klooriheksidiiniä ja ksylitolia sisältävällä purukumilla voitiin hiivan määrää vähentää 22 % (Simons D, Kidd EAM, Beighton D, Jones B. The effect of chlorhexidine/xylitol chewing-gum on cariogenic salivary microflora: A clinical trial in elderly patients. *Caries Res* 1997;31:91-96).

- Tiettyt ryhmät, kuten esimerkiksi pitkääikaissairaat ja vanhukset, 15 ovat myös alittiita yleisinfektiolle heikentyneen vastustuskyvyn, aliravitsemukseen ja kroonisten sairauksien takia. Myös suuhygienialla ja suun mikrobistolla on havaittu yhteys vanhusten alahengitysteiden infektiioihin, kuten keuhko-kuumeeseen ja keuhkoputken tulehduseen (ks. Scannapieco FA. Role of oral bacteria in respiratory infection. *J Periodontol* 1999;70:793-802). Infektio ole-20 tettavasti syntyy, kun suun patogeenisä mikrobeja joutuu aspiraation kautta hengitystehoihin. Pitkääikaishoitopilailla yleisimmin esiintyviä infektiota ovat ylempien ja alempien hengitysteiden infektiot (70 %), virtsatieinfektiot (12 %), gastroenteriitit ja ripuli (12 %) sekä iho- ja pehmytkudostulehdut (6 %) (Orr PH, Nicolle LE, Duckworth H, Brunka J, Kennedy J, Murray D et al. Febrile urinary infection in the institutionalized elderly. *Am J Med* 1996; 100:71-77). Hygieniainterviolla on pystytty vähentämään pitkääikaissairaanhoidossa olevien vanhusten ylähengitysteiden infektiota 16 % (Makris AT, Morgan L, Gaber DJ, Richter A, Rubino JR. Effect of a comprehensive infection control program on the incidence of infections in long-term care facilities. *Am J Infect Control* 25 2000;28:3-7).

- Hiivan toinen pääasiallinen esiintyvyysalue on genitaalialue; varsinakin naisilla hiivainfektiot ovat tavallisia. Vaginiitti eli emätintulehdus on yleisin gynekologinen oire ja yksi tavallisimmista oireista, joiden takia potilas hakeutuu lääkärin vastaanotolle (Mäkelä ym. 1988). Vaginiitin tavallisimpien 35 aiheuttajien on bakteeri, toiseksi yleisin aiheuttaja on hiivasieni. Useimmin

tavataan joko *C. albicans* - tai *C. glabrata* -lajia. *Candida albicans* -hiiva kuuluu emättimen normaaliflooraan, mutta ei tavallisesti aiheuta tulehdusta. Normaalisti emättimen bakteerifloora rajoittaa hiivan kasvua, mutta tietyissä oloissa hiivan kasvu riistäytyy hallinnasta. Hiivatulehdusen riskitekijät ovat

- 5 antibioottien käyttö (erityisesti laajaspektriset antibiootit), raskaus, sokeritauti, immuunivajausta aiheuttavat sairaudet ja kortikosteroidien käyttö. Hiivasieni todetaan 10 - 20 % gynekologisen poliklinikian potilaista, mutta vain osalla hiivasieni aiheuttaa kliinisen vulvovaginitin. Emäksinen pH suosii hiivan kasvua. Hiivan virulenssikyky riippuu hiivan pitoisuudesta, itiörihmojen
- 10 muodostuskyvystä (invasiivisuus), steroidireseptoreista ja kyvystä muodostaa esim. proteaaseja. Tutkimuksissa on havaittu sienirihmojen pystyvän tunkeutumaan emättimen epiteeliin (Mäkelä ym. 1988).

Maitohappobakteereita on käytetty vaihtelevin tuloksin emätintulehdusten ehkäisyyn. Jogurtin nauttiminen 6 kk vähensi *Candida* kolonisaatiota sekä emätintulehdusten lukumäärää (Hilton ym. 1992. Ingestion of yoghurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for Candidal vaginitis. *Ann Intern Med* 1992;116:353-357). Sen sijaan Shalevin työryhmän (1996) tutkimuksessa *Lactobacillus acidophilus* -jogurtti vähensi bakteerien aiheuttamia emätintulehdoksia, mutta ei *Candida*-hiivan aiheuttamia verrattuna pastöroituun jogurttiin (Shalev ym. 1996. Ingestion of yoghurt containing *Lactobacillus acidophilus* compared with pasteurized yoghurt as prophylaxis for recurrent Candidal vaginitis and bacterial vaginosis. *Arch Fam Med* 1996;5:593-596; Sieber R, Dietz U-T. *Lactobacillus acidophilus* and yogurt in the prevention and therapy of bacterial vaginosis. *Int Dairy J* 1998; 8:599-607; ks. myös Redondo-Lopez ym. 1990. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev Infect Dis* 1990;12:856-872).

Hiivasieni aiheuttaa myös virtsatiehytulehdusta (uretriitti).

Ruoansulatuskanavassa esiintyy useiden tutkimusten mukaan *C. albicansia* 20 - 40 % ihmisistä (Lennette ym. 1985. Manual of clinical microbiology, 4. painos. American Society for Microbiology, Washington D.C, 1985). Ruoansulatuskanavassa hiivan ylikasvu ilmenee yleensä ripulina.

Hiivaoireyhymästä eli hiivasynroomasta puhuttaessa tarkoitetaan yleensä maha-suolikanavassa lisääntynytä *Candida albicans* -hiivakasvua, jonka ajatellaan estävän immuunijärjestelmän toimintaa ja aiheuttavan erilaisia oireyhtymiä. Hiivan liikakasvuun on liitetty joukko systeemioireita, kuten kes-

- kushermosto-oireita, kiputiloja, väsymystä ja suolisto-oireita. Oletetaan, että oireet johtuvat hiivojen erittämistä toksiineista. Tieteellistä näyttöä oireiden ja hiivan välisestä yhteydestä ei kuitenkaan ole. Hiivasyndroomaa hoidetaan niukkahiiilihydraattisella, hiivattomalla ruokavaliolla, jossa lisäksi saatetaan suosia
- 5      happamia ja/tai runsaasti kuitua sisältäviä ruoka-aineita. Hapatetut ruoat ja erityisesti hapanmaitovalmisteet kuuluvat tärkeänä osana ruokavaliohoitoon. Maitohappobakteereja käytetäänkin usein tasapainottamaan häiriintynytä suolis-toflooraa.

Hiiva aiheuttaa siis monenlaisia sairauksia, sekä välittömästi että

10     välillisesti. Siten on jatkuva tarve löytää uusia keinoja hiivan kasvun ja toiminnan estämiseen, hiivan aiheuttamien tautien ennaltaehkäisyyn ja hoitamiseen sekä hiivan aiheuttaminen oireiden lievittämiseen.

Lääkehoidon vaihtoehdoksi tai sen lisäksi on nykyään pyritty hyödyntämään muitakin tapoja hoitaa terveyttä. Eräs uusimpia keinoja on terveysvaikuttisten ravintoaineiden tai luontaistuotteiden käyttäminen, mikä onkin kuluttajien keskuudessa tervetullut vaihtoehto. Sellaiset terveysvaikuttiset tuotteet, joilla on hiivojen kasvua ja toimintaa estäviä vaikutuksia, olisivat siten erittäin tervetullut lisä kaupan valikoimiin. Edullisesti tuotteiden tulisi olla kuluttajille miellyttäviä ja tutunomaisia ja siten helppo käyttää esimerkiksi osana normaalialia ruokavaliota.

Probioottien vaikutusta antimikrobisina aineina on kuvattu alan kirjallisuudessa. Maitohappobakteereilla on kyky tuottaa antimikrobisia yhdisteitä, orgaanisia hoppoja, maitohappoa, rasvahappoja, vetyperoksidia, diasetyyliä, hiiliidioksidia sekä bakteriosiineja ja siten ehkäistä patogenisten mikrobioiden kasvua (McGroarty JA. Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993;6:251-264). Erääät *Lactobacillus acidophilus*-kannat estivät *Candida* kasvua *in vitro* tuottamalla vetyperoksidia (Jack M, Wood JB, Berry DR. Evidence for the involvement of thiocyanate in the inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbios* 1990;62:37-46; Fitzsimmons N, Berry DR. Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*: evidence for the involvement of a peroxidase system. *Microbios* 1994;80:125-133). Myös *Lactobacillus rhamnosus* LGG:n, ATCC 53103, on havaittu tuottavan antimikrobista yhdistettä, mahdollisesti lyhytketjuista rasvahappoa, joka estää mm. *Escherichia coli*, *Pseudomonaksen*, *Salmonellan*, *Streptococcus*, *Bacilluksen*, *Clostridium* ja *Bifidobacte-*

*rium*in kasvua *in vitro* -olosuhteissa (Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrobial Agents Chemother* 1987;31:1231-1233).

- Maitohappobakteerit saattavat myös estää muiden mikrobiien adhe-  
 5 soitumista epiteelisoluihin. Mm. eräät *Lactobacillus acidophilus* ja *L. casei*-kannat estivät *C. albicansin* adheesiota 22 - 46 % uroepiteelisoluihin *in vitro* -olosuhteissa (Reid G, Tieszer C, Lam D. Influence of lactobacilli on the adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* to fibers and epithelial cells. *J Indust Microbiol* 1995;15:248-253). Eläinkokeissa *Lactobacillus rham-*  
 10 *nosus* LGG:n on todettu vähentäväni *C. albicansin* määrää hiirten ruoansulatuksanavassa sekä suun alueen kandidoosia stimuloimalla soluvälitteistä im-  
 muunivastetta *C. albicansin* vasta-aineille. (Wagner RD, Pierson C, Warner T, Dohnalek M, Farmer J, Roberts L et al. Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. *Infect Immun* 1997;65:4165-  
 15 4172; Wagner RD, Pierson C, Warner T, Dohnalek M, Hilty M, Balish E. Probiotic effects of feeding heat-killed *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* to *Candida albicans* -colonized immunodeficient mice. *J Food Protect* 2000;63 :638-644).

*Lactobacillus LC 705:n* ja *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS:n on yhdessä havaittu estäväni hiivojen kasvua jogurtissa ja maitorahkassa (Suomalainen T, Mäyrä-Mäkinen A. Propionic acid bacteria as protective cultures in fermented milks and breads. *Lait* 1999;79:165-174).

Maitohappobakteerit ja niiden solurakenteet voivat aktivoida elimis-  
 20 tön puolustuskykyä lisäämällä makrofagien ja luonnollisten tappajasolujen ak-  
 tiivisuutta, T- ja B-solujen määrää sekä vasta-aineiden pitoisuutta (Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, Agüero G, Gobbato N. Symposium: Probiotic bacteria for humans: Clinical systems for evalution of effectiveness. Immune system stimula-  
 25 tion by probiotics. *J Dairy Sci* 1995;78:1597-1606).

Myös *Lactobacillus rhamnosus* LGG:n on havaittu vahvistavan suo-  
 30 liston normaalialia puolustuskykyä haitallisia bakteereita, viruksia ja hiivoja vas-  
 taan (Kaila M, Isolauri E, Soppi E ym. Enchancement of the circulating anti-  
 body secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr Res* 1992;32:141-144; Wagner ym. 1997). Eläinkokeissa *Lacto-*  
*bacillus GG* on myös lisännyt syljen sekretorisen IgA:n pitoisuutta (Negretti F,  
 35 Casetta P, Clerici-Bagozzi D, Marini A. Researches on the intestinal and sys-

temic immunoresponses after oral treatments with *Lactobacillus GG* in rabbit. *Phisiopath Clin* 1997;7:15-21). Limakalvojen sekretorisen IgA:n tiedetään suojaavan hengitysteitä, ruoansulatuskanavaa ja urogenitaalielimiä infektiolta (Nagura H. Mucosal defence mechanism and secretory IgA system. *Bifidobacteria Microflora* 1990;9: 17-25). Täten maitohappobakteerit saattavat vähentää myös hengitystie- ja ruoansulatuskanavan infekatioita, mistä onkin saatu viitteitä päiväkotilapsilla tehdysä tutkimuksessa (Hatakka K, Savilahti F, Pönkä A, Meurman JH, Poussa T, Näse L, Saxelin M, Korpela R. The effect of long-term consumption of a probiotic milk on the infections of children attending day care centres: a double-blind randomised trial. Submitted to BMJ in May, 2000).

### Keksinnön lyhyt kuvaus

Esillä olevan keksinnön tavoitteena on aikaansaada keino, jonka avulla hiivan kasvua ja toimintaa ihmisessä ja eläimissä voidaan estää tai vähentää. Tavoite saavutetaan keksinnön mukaisella tuotteella, käytöllä ja menehtämällä, joille on tunnusomaista se, mitä sanotaan itsenäisissä patenttivaatimuksissa. Keksinnön edulliset suoritusmuodot ovat epäitsenäisten patenttivaatimusten kohteena.

Esillä oleva keksintö perustuu tiettyjen probioottien käyttöön hiivan kasvun ja toiminnan estämiseksi, hiivan aiheuttamien tautien ennaltaehkäisemiseksi ja hoitamiseksi sekä hiivan aiheuttamien oireiden lievittämiseksi ihmisessä ja eläimissä.

Keksintö koskee siten mikrobiin *Lactobacillus rhamnosus* LGG, ATCC 53103, *Lactobacillus rhamnosus* LC705, DSM 7061, ja *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS, DSM 7067, käyttöä hiivan estoon ihmisiä ja eläimiä.

Keksinnön tarkoitusta varten bakteereja voidaan nauttia erikseen tai yhdistelmänä. Niitä voidaan nauttia sellaisenaan, esimerkiksi lyofilisoidun valmisteen muodossa, tai käyttää syötäväksi tarkoitettujen tuotteiden, kuten maistotuotteiden tai juomien, lisänä tai ainesosana. Yhdistelmän muodostamiseksi voidaan käyttää bakteerien sekaviljelmää tai jokaisen puhdasviljelmää. Yhdistelmästä voidaan myös valmistaa yksikköannosmuoto, kuten kapseli. Kapseli voi sisältää kaikkia edellä mainittuja bakteereita, edullisesti lyofilisoituina viljelminä, tai sarjaan voi kuulua kolme kapselia, yksi kutakin bakteeria varten.

Keksintö koskee siten myös bakteerien *Lactobacillus rhamnosus* LGG, ATCC 53103, *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* LC705, DSM 7061, ja *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS, DSM 7067, käyttöä valmistettaessa hiivan estoon tarkoitettua tuotetta.

5 Tuote voi olla esimerkiksi elintarviketeollisuuden tai lääketieteellisen tuote, terveysvaikuttelun tuote tai luontaistuote. Edullisina tuotteina esitetään terveysvaikuttelisia meijeriteollisuuden tuotteita, kuten juustoa, johon mikrobit on lisätty tuotteen valmistukseen yhteydessä. Mikrobit voivat toimia myös hapatteena ja juuston tai muun tuotteen rakenteen muokkaajina. Toisena edullisena tuoteryhmänä esitetään farmaseuttiset valmisteet, etenkin tabletit ja kapselit, jotka edellä mainittujen mikro-organismien lisäksi sisältävät tällaisissa tuotteissa tavaramaisia apu- ja lisääaineita, sekä mahdollisesti myös muita aktiivi-aineita. Erityisen edullisina tuotteina esitetään suun kautta otettavat valmisteet, kuten tabletit ja kapselit, jotka LGG:n, LC705:n ja PJS:n lisäksi sisältävät ksylitolia. Keksinnön mukaisesti käytettävien mikrobioiden lisäksi tuotteet voivat sisältää myös muita mikrobeja.

10

15

Tässä esitetyt bakteerit, yhdistelmät ja muut tuotteet vaikuttavat ihmisen elimistössä olevan hiivan kasvuun ja toimintaan, ja ennaltaehkäisevät hiivatartuntoja. Ne ovat siten käyttökelpoisia hiivan aiheuttamisen vaivojen ja 20 tautien ennalta ehkäisyyn ja hoitoon, oireiden lievittämiseen sekä yleisen terveydentilan parantamiseen.

Keksintö koskee myös menetelmää hiivojen kasvun estämiseksi ja hiivojen aiheuttamien tautien ennaltaehkäisemiseksi tai hoitamiseksi tai oireiden lievittämiseksi eläimessä tai ihmisessä, joka menetelmä käsittää mikrobioiden 25 *Lactobacillus rhamnosus* LGG, ATCC 53103, *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* LC705, DSM 7061, ja *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS, DSM 7067, antamisen niitä tarvitsevalle yksilölle riittävä määrä halutun vai-kuksen aikaansaamiseksi.

### 30           **Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus**

Esillä oleva eksintö perustuu siis tiettyjen probioottien käyttöön hiivojen kasvun ja toiminnan estämiseen ihmisen tai eläimen elimistössä.

Probiootit ovat eläviä mikrobeja, jotka ihmissele tai eläimelle annettuna edistävät isännän terveyttä parantamalla suiston mikrobitasapainoa, tämän 35 kautta tai lisäksi probiooteilla voi olla paljon muitakin hyödyllisiä ominaisuuksia.

Tärkeimmät probiootit ovat maitohappobakteerit, propionihappobakteerit ja bifidobakteerit. Niitä esiintyy luonnostaan ihmisen ja eläinten elimistössä. Lakto-basillit kuuluvat tärkeänä osana ihmisen elimistön normaalialia bakteerifloora (Redondo-Lopez V, Cook RL, Sobel JD. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev Infect Dis* 1990;12:856-872). Propionihappobakteereja löytyy puolestaan iholta ja ruoansulatuskanavasta (MacFarlane GT, Allison C, Gibson SAW, Cummings JH. Contribution of the microflora to proteolysis in the human large intestine. *J Appl Bacteriol* 1988;64:37-46). Turvallisuutensa ja terveysvaikuttisuutensa takia probiootteja käytetään paljon myös elintarvikkeissa.

Keksinnön mukaisesti käytettäväät kannat *Lactobacillus rhamnosus* LGG, ATCC 53103, *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* LC705, DSM 7061, ja *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS, DSM 7067, on kuvattu teknikan tasossa.

*Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) on kuvattu mm. US-patentissa 5,032,399, Gorbach & Goldin. Kanta on eristetty ihmisen ulosteesta, se pystyy kasvamaan hyvin pH:ssa 3 ja kestää elävänä alhaisemmissakin pH-arvoissa sekä korkeissa sappihappopitoisuksissa. Kannan adhesiivisyys on erinomainen sekä mukus- että epiteelisoluihin. Maitohapon tuotto glukoosista on hyvä, MRS-liemessä kasvatettuna kanta tuottaa maitohappoa 1,5 – 2 %. Kanta ei fermentoi laktoosia. Kanta käyttää seuraavia hiilihydraatteja: D-arabinoosi, riboosi, galaktoosi, D-glukoosi, D-fruktoosi, D-mannoosi, ramnoosi, dulsitoli, inositol, mannitoli, sorbitoli, N-asetylglukoosiamiini, amygdaliini, arbutiini, eskuliini, salisiini, sellubioosi, maltoosi, sakkaroosi (hitaasti), trehaloosi, melitsitoosi, gentibioosi, D-tagatooosi, L-fukoosi, ja glukónaatti. Kanta kasvaa hyvin +15 °C - 45 °C lämpötiloissa, optimin ollessa 30 - 37 °C. *Lactobacillus rhamnosus* GG on tallennettu talletuslaitokseen the American Type Culture Collection tallitusnumerolla ATCC 53103.

*Lactobacillus rhamnosus* GG on ihmiselle luonnollinen bakteeri-kanta, jonka probioottisia valkutuksia on tutkittu erittäin paljon (Saxelin M. Lactobacillus GG - a human probiotic strain with thorough clinical documentation. *Food Rev Int* 1997;13:293-313). Se pysyy elinkykyisenä ruoansulatuskanavassa ja pystyy väliaikaisesti kolonisoimaan suolistoa (Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L, Salminen S. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 1992;37:121-128). LGG näyttää myös kykenevän kolonisoimaan suonteloa

- ainakin väliaikaisesti, sillä bakteria löytyi koehenkilöiden syljestä vielä 2 viikon ajan, kun 7 päivää kestänyt LGG-jogurtin nauttiminen oli lopetettu (Meurman JH, Antila H, Salminen S. Recovery of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) from saliva of healthy volunteers after consumption of yoghurt prepared with 5 the bacterium. *Microbiol Ecol Health Dis* 1994;7:295-298). LGG:tä on nykyisin useissa kaupallisissa hapanmaito- ja mehuvalmisteissa (Gefilus®).

*Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* LC705 on tarkemmin kuvattu FI-patentissa 92498, Valio Oy. LC705 on gram-positiivinen, lyhyt, ketjuuntuva sauva, se on homofermentatiivinen, heikosti proteolyyttinen, kasvaa hyvin 15 - 45 10 °C:ssa, ei muodosta ammoniakkia arginiinista, on katalaasi-negatiivinen, tuottaa MRS-liemessä (LAB M) kasvaessaan maitohappoa (1,6 %), joka on optiselta aktiivisuudeltaan L(+)-muotoa, hajottaa sitraattia (0,169 %) muodostaaen diasetyyilia ja asetoiniinia, ja fermentoi ainakin seuraavia hiilihydraatteja (sokereita, sokerialkoholeja): riboosi, galaktoosi, D-glukoosi, D-fruktoosi, D-mannoosi, L-sorboosi, 15 ramnoosi, mannitoli, sorbitoli, metyyli-D-glukosidi, N-asetyylglukosamiini, amygdaliini, arbutiini, eskuliini, salisiini, sellobioosi, maltoosi, laktoosi, sakkaroosi, trehaloosi, melitsitoosi, gentiobioosi, D-turanoosi ja D-tagatoosi. LC705 adheroituu mukus-soluuihin huonosti, mutta sen sijaan adheroituu kohtalaisesti epiteelisoluihin. Kannan elinkyky alhaisissa pH-arvoissa sekä korkeissa sappihappopitoi- 20 suksissa on hyvä. Kanta kestää hyvin 5 %:n suolapitoisuksia ja kohtalaisesti 10 %:n suolapitoisuksia. *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* LC705 on talletettu talletuslaitokseen Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM) talletusnumerolla DSM 7061.

*Lactobacillus rhamnosus* LC 705 käytetään mm. emmentaljuustojen 25 valmistuksessa estämään klostridien aiheuttamaa voihappokäymistä. Kantaa käytetään myös elintarvikkeissa, joissa sen funktio on hiivojen ja homeiden kasvun esto. Biosäilönnässä LC705 -kanta yhdistetään *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS:n kanssa (FI 92498).

*Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS (PJS) on myös 30 kuvattu tarkemmin FI-patentissa 92498, Valio Oy. PJS on gram-positiivinen, lyhyt sauva, se fermentoi glukoosia, fruktoosia, galaktoosia ja laktoosia, fermentoi hyvin laktaattia, ja sen optimikasvulämpötila on 32 °C. Kannan elinkyky alhaisissa pH-arvoissa sekä korkeissa sappihappopitoisuksissa on erinomainen. *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS on talletettu talletuslaitokseen Deut-

sche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH talletusnumerolla DSM 7067.

Keksinnön mukaisesti käytettävien mikrobioiden lisäksi valmistettaviin tuotteisiin voi sisältyä muitakin mikro-organismeja, kuten esimerkiksi meijeriteollisuudessa käytettyihin hapatteisiin sisältyviä mikro-organismeja ja probiootteja. Lukuisia kantoja on hyvin dokumentoitu ja kaupallisesti saatavilla esimerkiksi hapatevalmistajilta Hansen A/S, Tanska, ja Danisco/Wiesby GmbH, Saksa.

Keksinnön mukaista käyttöä varten mikro-organismeja kasvatetaan alalla tavanomaisia menetelmiä noudattaen. Mikro-organismeja voidaan kasvattaa puhdasviljelminä tai erilaisina sekaviljelminä. Viljelmiä voidaan käyttää sellaisenaan tai käsitellä halutulla tavalla, esimerkiksi puhdistaa, konsentroida, lyofilisoida tai viimeistellä erilaisiksi valmisteiksi. Keksinnön mukaisesti käytettävien mikro-organismien valmistus on kuvattu yksityiskohtaisesti mm. julkaisuissa FI 92498 ja FI 20010157.

Keksinnön mukaisesti probiootteja käytetään riittävä määrä halutun hiivanestovaikutuksen aikaansaamiseksi. Kunkin probiootin määrä voi siten vaihdella laajalla alueella riippuen mm. probioottien yhteisestä solumäärästä, päivän kokonaisannoksesta ja tuotteen muista ominaisuuksista ja aineosista. Yleensä yhdistelmä sisältää probiootteja noin  $10^6$  -  $10^{10}$  pmv päivittäisessä annoksessa.

Keksinnön mukaisesti probiootit soveltuват käytettäväksi sellaisenaan tai formuloituina esimerkiksi kapselin, pillerin tai tabletin muotoon farmaseuttisten valmisteiden tavanomaisia valmistustapoja noudattaen. Keksinnön mukaisesti käytettävät probiootit voidaan myös lisätä erilaisiin nautittavaksi tarkoitettuihin tuotteisiin, kuten elintarvikkeisiin, juoma- tai makeisteollisuuden tuotteisiin, terveysvaikutteisiin tuotteisiin, luontaistuotteisiin jne. Edullisina käyttömuotoina pidetään esillä olevan keksinnön puitteissa mainittuja probiootteja sisältävät meijeriteollisuuden tuotteet, erityisesti juustot ja levitteet, jogurtit ja muut hapatetut maitotuotteet sekä lastenruuat, mehet ja keitot, sekä kapselit, pillerit ja tabletit.

Lopputuotteet valmistetaan tavanomaisia menettelytapoja käyttäen, lisenäten probiootteja joko muun valmistuksen yhteydessä tai sen jälkeen, lopputuoteen viimeistelyn yhteydessä.

Julkaisussa tarkemmin kuvatuissa kokeissa on tutkittu keksinnön mukaisesti käytettävien probioottien vaikutusta suun hiivojen estoon. Näistä hiivoista

- yleisin on *Candida albicans*, joka laajalti elimistössä esiintyvä ja edustavana hiivalajina on erittäin käytökelpoinen myös suussa esiintyvien muiden hiivalajien samoin kuin muualla elimistössä esiintyvien muiden hiivalajien malliorganismina.
- Esimerkeissä esitetyt tulokset osoittavat, että keksinnön mukaisesti käytettävillä 5 probiooteilla on tilastollisesti merkitsevä vähentävä vaikutus suun hiivojen määärään. Alustavien tulosten perusteella on ilmeistä, että keksintö soveltuu laajalti estämään, vähentämään tai hidastamaan myös muualla elimistössä, kuten suolistossa ja urogenitaalialueella esiintyvien hiivojen kasvua ja toimintaa.
- Keksintöä kuvataan yksityiskohtaisesti seuraavien esimerkkien avulla.
- 10 Nämä esimerkit annetaan vain keksinnön valaisemiseksi eikä niitä pidä katsoa sen suoja- ja rajoittavaksi.

#### **Esimerkki 1**

##### **Probioottien vaikutus hiivan *Candida albicans* esiintyyteen**

- 15 Tutkimuksen päätavoitteena oli selvittää voidaanako probioottiyhdistelmällä, joka sisältää laktobasilleja ja propionihappobakteereja, vähentää hiivan *Candida albicans* esiintyyttä suussa. Koemateriaaliksi otettiin Emmental-tyyppinen juusto, joka sisälsi eläviä *Lactobacillus rhamnosus* LGG, ATCC 53103-, *Lactobacillus rhamnosus* LC705, DSM 7061-, ja *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS, DSM 7067 -mikrobieja. Juusto valittiin, koska se on normaalilta ruokavalioon kuuluva tuote, jota on mieluista syödä ja helppo annostella tutkimuksen tarkoitusten mukaisesti. Vertailujuusto oli Edam-juusto, joka ei sisältänyt kyseisiä kolmea bakteerikantaa, mutta sen siinä sisälsi normaalit hapatemikrobit, jotka ovat laktokokkeja.
- 20 25 Tutkimukseen rekrytoitiin 240 henkilöä, joiden ikä vaihteli 70:stä saataan vuoteen.

- Tutkimus toteutettiin lumekontrolloituna kaksoissokkokokeena, jossa oli rinnakkaiset tutkimusryhmät. Tutkimus kesti kaikkiaan 19 viikkoa, jakautuen 3 viikon run-in jaksoon sekä 16 viikon intervientoon. Koko tutkimuksen aikana 30 probioottisia bakteereja sisältävien elintarvikkeiden käyttö oli kiellettyä. Kiellettyjen elintarvikkeiden listalla olivat mm. Emmental- ja Polar-juustot, maitorahka, sekä eläviä maitohappobakteereja sisältävät hapanmaitotuotteet, probioottimehet ja erilaiset kapselit ja puristeet.

- 35 Koehenkilöt noudattivat tavanomaisia suuhygieniatottumuksia ja elintapojaan koko tutkimuksen ajan.

Interventio: Juustointerventio kesti 16 viikkoa (vk). Tänä aikana puolet koehenkilöistä nautti päivittäin 50 g. (= 6 - 7 viipaleetta) probioottibakteereita sisältävää juustoa, puolet saman verran kontrollijuustoa. Juustot nautittiin kuumentamattomina aamuun illoin ruokailun, lääkkeiden nauttimisen ja ham-paiden pesun jälkeen. Probioottijuusto sisälsi *L. rhamnosus* LGG:tä  $10^7$  cfu/g, *L. rhamnosus* LC705:tä  $10^7$  cfu/g ja *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS:ää  $10^7$  cfu/g. Näiden kokonaisbakteerimäääräksi tuli siis  $10^9$  -  $10^{10}$  cfu/pv.

Suun kliniset tarkastukset: Suun tarkastukset ja sylkinäytteiden otto suoritettiin tutkittavien luona palvelutaloissa/vanhainkodeissa. Klinisessä tar-kastuksessa rekisteröitiin paikatut, poistetut ja karioituneet hampaat (DMF). Myös parodontiumin kunto tarkastettiin ja luokiteltiin CPI-indeksillä. Mahdolliset suun limakalvojen muutokset rekisteröitiin (mm. infektiot, värijäymät, haavaumat, lichenoidit leesiot ja haavaumat, hyperplasiat, leukoplakia, erythroplakia ja muut). Kliniset tarkastukset tehtiin tutkimuksen alussa (0 vk) ja lopussa (16 vk).

Sylkinäytteet: Sylkinäytteet hiivojen, syljeneritysnopeuden ja pusku-rikapasiteetin määrittämiseksi otettiin aamuisin klo 8 - 11 välisenä aikana. Näytteenotto pyrittiin suorittamaan samalla ihmislle aina samaan aikaan. Tut-kittavien oli oltava syömättä ja pesemättä hampaitaan 1 tunti ennen näyt-teenottoa. Sylkinäytteet hiivan määrittämistä varten otettiin tutkimuksen alussa (0 vk), puolivälissä (8 vk) ja lopussa (16 vk). Syljen eritysnopeus ja puskurika-pasitetti määritettiin alku- (0 vk) ja loppunäytteistä (16 vk).

Hiivojen määrittämiseksi syljesta otettiin suun limakalvolta pumpuli-tikkunäyte. Hiivojen (lähinnä *Candida albicans*) toteamiseen käytettiin Dento-cult CA viljelymenetelmää, jossa putkia inkuboidaan lämpökaapissa 37 °C 2 vuorokautta ja kasvu määritellään sen jälkeen semikvantitatiivisesti asteikolla 0-3 (0 = ei pesäkköitä, 1 = 1 - 20 pmy/liuska, 2 = 21 - 50 pmy, 3 > 50 pmy).

Syljen eritysnopeuden määrittämiseksi mitattiin sekä leposyki että stimuloitu sylki. Hyposalivaation raja-arvona leposyljelle pidetään 0,1 ml/min, joten leposylkeä kerättiin 15 min (1,5 ml / 15 min). Stimuloitua sylkeä kerättiin 5 minuuttia (hyposalivaation raja-arvo 3,5 ml / 5 min).

Syljen puskurointikyky on yhteydessä eritysnopeuteen. Tästä syystä pusurikapasiteetti mitattiin Dentobuff-testillä. Testi tehtiin stimuloidusta syljes-tä, koska leposyljen puskurointikyky on aina heikko.

Hiivan määrä interventiojakson päätyessä oli tutkimuksen primaari vastemuuttuja. Ryhmien välistä eroa hiivan esiintyvyyden ja määrän suhteeseen testattiin chi-neliötestillä. Lisäksi huomioitiin hiivan esiintyvyys tai määrä baseline-tilanteessa ja mahdolliset demografiset tekijät (kuten ikä, sukupuoli, pro-  
5 teesit) käyttämällä logistista regressioanalyysiä. Myös syljen eritysnopeus ja puskurikapasiteetti huomioitiin tällöin tarvittaessa selittävinä tekijöinä. Vastaavalla tavalla analysoitiin korkean pitoisuuden esiintyvyys. Syljen eritysnopeudessa ja puskurikapasiteetissa tapahtuneet muutokset kuvailtiin.

Tulokset on esitetty seuraavissa taulukoissa, joissa A on probiootti-  
10 juustoa syöneiden ryhmä, B kontrolliryhmä. Pesäkemääriä on esitetty seuraavasti:

- 15 0 = ei pesäkkeitä
- 1 = 1 - 20 pmy/liuska
- 2 = 20 - 50 pmy/liuska
- 3 = yli 50 pmy/liuska

Taulukossa 1 esitetään tutkimuksen alussa sekä 8 ja 16 viikon in-  
tervention jälkeen mitatut tarkat hiivatulokset niiltä henkilöiltä, joilta on kaikki  
kolme mittauskertaa (ryhmässä A n = 92, ryhmässä B n = 100). Taulukossa 2  
esitetään luokitellut hiivamäärit tutkimuksen alussa sekä 8 ja 16 viikon inter-  
vention jälkeen niiltä henkilöiltä, joilta on kaikki kolme mittauskertaa (ryhmässä  
20 A n = 92, ryhmässä B n = 100).

**Taulukko 1**  
**Tarkat hiivatulokset tutkimuksen alussa ja 8 viikon ja 16 viikon intervention jälkeen**

	<b>A</b>		<b>B</b>		
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	
<b>Baseline</b>	0	27	29,3	30	30,0
	1	37	40,2	42	42,0
	2	17	18,5	14	14,0
	3	11	12,0	14	14,0
<b>8 vko</b>	0	32	34,8	37	37,0
	1	37	40,2	32	32,0
	2	10	10,9	15	15,0
	3	13	14,1	16	16,0
<b>16 vko</b>	0	35	38,0	33	33,0
	1	38	41,3	33	33,0
	2	11	12,0	17	17,0
	3	8	8,7	17	17,0

**Taulukko 2**  
**Luokitellut hiivapiltoisuudet tutkimuksen alussa ja 8 ja 16 viikon intervention jälkeen**

**0 vs. 1-4**

	<b>A</b>		<b>B</b>		
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	
<b>Baseline</b>	0	27	29,3	30	30,0
	1-4	65	70,7	70	70,0
<b>8 vko</b>	0	32	34,8	37	37,0
	1-4	60	65,2	63	63,0
<b>16 vko</b>	0	35	38,0	33	33,0
	1-4	57	62,0	67	67,0

**0-1 vs. 2-4**

	<b>A</b>		<b>B</b>		
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	
<b>Baseline</b>	0-1	64	69,6	72	72,0
	2-4	28	30,4	28	28,0
<b>8 vko</b>	0-1	69	75,0	69	69,0
	2-4	23	25,0	31	31,0
<b>16 vko</b>	0-1	73	79,3	66	66,0
	2-4	19	20,7	34	34,0

**0-2 vs. 3-4**

	A		B	
	n	%	n	%
Baseline 0-2	81	88,0	86	86,0
3-4	11	12,0	14	14,0
8 vko 0-2	79	85,9	84	84,0
3-4	13	14,1	16	16,0
16 vko 0-2	84	91,3	83	83,0
3-4	8	8,7	17	17,0

Ryhmät A ja B verrattiin toisiinsa hiivan esiintymisen suhteen 8 ja 16 viikon intervention jälkeen sekä suoraan että ottamalla mahdolliset sekoittavat tekijät huomioon. Näitä ovat ikä, sukupuoli, asumismuoto, diagnoosien lukumäärä, lääkkeiden lukumäärä, BMI, syljen virtausnopeus, puskurikapasiteetti ja mahdollinen proteesi. Sekoittavien tekijöiden huomioon ottaminen tapahtui käyttäen menetelmänä askeltaavaa logistista regressiota. Ryhmä ja hiivan baseline-tilanne pakotetaan malliin (block 1) ja listan sekoittavat tekijät huomioidaan askeltaen (block 2; sisäänottokriteerinä  $p$  alle 0,15). Tulokset on esitetty seuraavissa taulukoissa, joissa taulukossa 3 esitetään suora vertailu kohtalaisen korkean hiivan esiintymisen ryhmässä, eli luokat 2 - 4, taulukossa 4 sekoittavat tekijät huomioidaan, taulukossa 5 esitetään suora vertailu korkean hiivan esiintymisen ryhmässä, eli luokat 3 - 4, ja taulukossa 6 sekoittavat tekijät huomioidaan. Näissä taulukoissa lyhenne OR = odds ratio = suhteellinen riski, riskisuhte, ja lyhenne CI for OR = confidence interval odds ratio = (riskisuhteen) luottamusväli.

**Taulukko 3****Kohtalaisen korkean (luokat 2-4) hiivan esiintyminen****a) 8 viikon jälkeen**

	B	p-value	OR	95% CI for OR
Ryhmä A	-0,469	<b>0,178</b>	<b>0,625</b>	<b>0,316 to 1,239</b>
Hiiva alussa 2-4	2,382	<0,0001	10,825	5,450 to 21,500
Vakio	-1,520	<0,0001		

**b) 16 viikon jälkeen**

	B	p-value	OR	95% CI for OR
Ryhmä A	-0,946	<b>0,014</b>	<b>0,388</b>	<b>0,182 to 0,826</b>
Hiiva alussa 2-4	2,244	<0,0001	9,4355	4,461 to 19,957
Vakio	-1,390	<0,0001		

**Taulukko 4**  
**Kohtalaisen korkean (luokat 2-4) hiivan esiintyminen sekotta-vat tekijät huomioiden**

		B	p-arvo	OR	95% CI for OR
Step 1	Ryhmä A	-1,229	<b>0,0082</b>	<b>0,293</b>	<b>0,118 to 0,728</b>
	Hiiva alussa 2-4	1,911	<0,0001	6,757	2,875 to 15,884
	Puskurikapasiteetti		0,0002		
	Puskurikapasiteetti (H)	-2,318	<0,0001	0,098	0,032 to 0,299
	Puskurikapasiteetti (M)	-1,614	0,0113	0,199	0,057 to 0,694
	Constant	0,481	0,3896	1,617	
Step 2	Ryhmä A	-1,378	<b>0,0043</b>	<b>0,252</b>	<b>0,098 to 0,649</b>
	Hiiva alussa 2-4	1,845	<0,0001	6,325	2,636 to 15,178
	Puskurikapasiteetti		0,0003		
	Puskurikapasiteetti (H)	-2,388	<0,0001	0,092	0,029 to 0,290
	Puskurikapasiteetti (M)	-1,588	0,0152	0,204	0,057 to 0,737
	Proteesi (status 1)	1,117	0,0390	3,057	1,058 to 8,831
	Constant	-0,246	0,7165	0,782	

**Taulukko 5**  
**Korkean (luokat 3-4) hiivan esiintyminen**

a) 8 viikon jälkeen

	B	p-value	OR	95% CI for OR
Ryhmä A	0,029	<b>0,956</b>	<b>1,029</b>	<b>0,373 to 2,837</b>
Hiiva alussa 3-4	4,022	<0,0001	55,8	18,7 to 166,8
Vakio	-2,782	<0,0001		

b) 16 viikon jälkeen

	B	p-value	OR	95% CI for OR
Ryhmä A	-0,824	<b>0,098</b>	<b>0,439</b>	<b>0,165 to 1,164</b>
Hiiva alussa 3-4	2,420	<0,0001	11,244	4,186 to 30,208
Vakio	-2,142	<0,0001		

**Taulukko 6**  
**Korkean (luokat 3-4) hiivan esiintyminen sekoittavat tekijät**  
**huomioiden**

		B	p-arvo	OR	95% CI for OR
Step 1	Ryhmä A	-1,067	<b>0,0657</b>	<b>0,344</b>	<b>0,110 to 1,072</b>
	Hiiva alussa 3-4	2,221	0,0003	9,216	2,798 to 30,359
	Puskurikapasiteetti		0,0370		
	Puskurikapasiteetti (H)	-1,629	0,0142	0,196	0,053 to 0,721
	Puskurikapasiteetti (M)	-0,551	0,4525	0,576	0,137 to 2,428
	Vakio	0,982	0,1136	0,375	
Step 2	Ryhmä A	-1,213	<b>0,0437</b>	<b>0,297</b>	<b>0,091 to 0,966</b>
	Hiiva alussa 3-4	2,300	0,0002	9,974	2,979 to 33,396
	Puskurikapasiteetti		0,0238		
	Puskurikapasiteetti (H)	-1,807	0,0080	0,164	0,043 to 0,624
	Puskurikapasiteetti (M)	-0,726	0,3339	0,484	0,111 to 2,109
	Naissukupolvi	-0,956	0,0991	0,385	0,124 to 1,197
Step 3	Vakio	-0,154	0,8452	0,857	
	Ryhmä A	-1,475	<b>0,0222</b>	<b>0,229</b>	<b>0,065 to 0,810</b>
	Hiiva alussa 3-4	2,213	0,0004	9,145	2,704 to 30,924
	Puskurikapasiteetti		0,0256		
	Puskurikapasiteetti (H)	-1,846	0,0086	0,158	0,040 to 0,625
	Puskurikapasiteetti (M)	-0,781	0,3151	0,458	0,100 to 2,101
	Naissukupolvi	-1,371	0,0305	0,254	0,073 to 0,879
	Proteesi (status 1)	1,274	0,1003	3,576	0,782 to 16,350
	Vakio	-0,713	0,4344	0,490	

Tulokset osoittavat, että ikääntymisen, proteesien käyttö sekä syljen eritysnopeuden väheneminen olivat selkeästi yhteydessä lisääntyneeseen hivamäärään. Lähtötilan hiivojen määrä oli puolestaan vähäisempi, mikäli tutkittava ilmoitti ennen tutkimuksen aloittamista käytäneensä maitohappobakteereita sisältäviä tuotteita säennöllisesti.

Tarkasteltaessa pelkkiä hiivatuloksia, ilman että sekoittavia tekijöitä otetaan huomioon, nähdään, että probioottiryhmässä hivamäärän lasku oli runsaampaa kuin kontrolliryhmässä. Riippumatta siitä tarkastellaanko hiivan esiintyyvyyttä (1-4), kohtalaisen hiivan esiintyyvyyttä (2-4), tai korkeiden hiivojen 10 esiintyyvyyttä (3-4) huomataan, että probioottiryhmäläisten osuus pienenee näissä ryhmissä intervention edetessä. Kontrolliryhmäläisten osuudet näissä ryhmissä eivät puolestaan muutu näin selkeästi. Korkeamman hivamäärän ryhmissä tutkittavien osuuksia näyttää kontrolliryhmässä jopa kasvavan.

Kun sekoittavia tekijöitä huomioidaan, havaitaan probiootti-intervention pienentävän tilastollisesti merkitsevästi sekä kohtalaisen korkean (2-4) että korkean (3-4) hivamäärän esiintyyvyyttä kontrolliryhmään verrattuna.

Tulokset osoittavat siten, että käytämällä juustoa, joka sisälsi edellä mainitut probiootit, saatiiin aikaan merkitsevä pieneneminen hiivojen määrään. Esillä oleva keksintö on siten käyttökelpoinen hiivojen estoon keksinnön tavoitteiden mukaisesti.

## Patenttivaatimuksset

1. Mikrobien *Lactobacillus rhamnosus* LGG, ATCC 53103, *Lactobacillus rhamnosus* LC705, DSM 7061, ja *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS, DSM 7067, käyttö valmistettaessa hiivan estoon tarkoitettua tuotetta.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen mikrobien käyttö, tunnettua siitä, että valmistetaan elintarviketeollisuuden tai lääketeollisuuden tuotetta, terveysvaikutteista tuotetta tai luontaistuotteita.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen mikrobien käyttö, tunnettua siitä, että valmistetaan elintarviketuotetta.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen mikrobien käyttö, tunnettua siitä, että valmistetaan maitotuotetta, edullisesti juustoa.
5. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen mikrobien käyttö, tunnettua siitä, että valmistuksessa käytetään lisäksi muita, tavaramaisia (hapate)bakteereita.
6. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen mikrobien käyttö, tunnettua siitä, että muodostetaan mikrobeja sisältävä yksikköannosmuoto.
7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen mikrobien käyttö, tunnettua siitä, että annosmuoto on suun kautta nautittava valmiste.
8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen mikrobien käyttö, tunnettua siitä, että annosmuoto on kapseli tai tabletti, joka mikrobien lisäksi sisältää ksytilolia.
9. Menetelmä hiivojen kasvun estämiseksi ja hiivojen aiheuttamien oireiden lievittämiseksi eläimessä tai ihmisessä, joka menetelmä käsittää mikrobien *Lactobacillus rhamnosus* LGG, ATCC 53103, *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* LC705, DSM 7061, ja *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS, DSM 7061, antamisen niitä tarvitsevalle yksilölle riittävä määrä halutun vaikutuksen aikaansaamiseksi.

**(57) Tiivistelmä**

Keksintö liittyy mikrobiin *Lactobacillus rhamnosus* LGG, ATCC 53103, *Lactobacillus rhamnosus* LC705, DSM 7061, ja *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS, DSM 7067, käyttöön hiivan kasvun estämiseksi, hiivan aiheuttamien tautien ennaltaehkäisemiseksi ja hoitamiseksi, ja hiivan aiheuttamien oireiden lievittämiseksi eläimessä tai ihmisesä.

**(57) Sammandrag**

Uppfinningen avser användning av mikroberna *Lactobacillus rhamnosus* LGG, ATCC 53103, *Lactobacillus rhamnosus* LC705, DSM 7061 och *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* PJS, DSM 7067 för att förhindra tillväxt av jäst, för att förebygga och behandla sjukdomar förorsakade av jäst och för att lindra symptom förorsakade av jäst i djur eller mänsk.